

10 . 細胞化学部

部長 花田 賢太郎

概要

当部の目的は、「感染症その他の特定疾病に関する細胞化学的及び細胞生物学的研究に関することをつかさどる」ことであり、細菌、ウイルス、プリオン等の病原体による感染症の発症要因をその宿主細胞の面から解析する方向で研究に取り組んでいる。特に、病原体の感染とその生体防御の様々な局面において重要な役割を担っている宿主細胞膜の機能解明を当部の研究主軸にしている。更に、感染症の分子レベルからの基礎研究の成果に立脚して、疾病の予防、診断、治療のための応用研究も行っている。

当部での主要研究課題としている高等動物細胞の膜構造とその機能解析の遺伝生化学的・細胞生物学的研究は、感染症研究を含む医学・生物学分野での幅広い応用面を有する課題である。本年度も、膜脂質の代謝と機能に関する研究、毒素進入に関わる研究、ウイルス感染における細胞機能の研究、抗感染症薬を指向した代謝阻害剤の開発研究など、幅広い分野で成果を挙げた。

プリオン病に関する研究では、異常プリオンの細胞内蓄積を抑制する分子の開発や、サルへ伝播させた異常プリオンの生体内分布解析を行うなど着実に成果を挙げた。さらに、平成 13 年 12 月からウェスタンブロッティング法による牛海綿状脳症(BSE)の行政検査を担当し、平成 18 年度は 7 件の検査を実施した。

人事異動では、平成 18 年 4 月 1 日付けで、花田賢太郎が部長職を拝命し、萩原健一主任研究官が第一室長に昇任し、前濱朝彦が東京都臨床医学総合研究所から第四室長として着任した。また、7 月 1 日付けで深澤征義主任研究官が第三室長に昇任した。そして、11 月 1 日付けで谷田以誠が順天堂大学大学院医学研究科から第二室長として着任し、山地俊之が理化学研究所から第二室研究員として着任した。一方、平成 19 年 3 月 31 日付けで三浦雅美研究員が定年退職した。三浦研究員の当部および研究所への長年の貢献に感謝の意を表したい。大変残念な出来事として、プロスタグランジン合成制御機構の研究を中心に活躍し、様々な点で当部に貢献して下さっていた田中康仁主任研究官が平成 19 年 2 月 2 日に享年 58 歳で病没された。細胞化学部一同、田中主任研究官のご冥

福を心よりお祈り申し上げます。

本年度も当研究部の研究に対し、經常研究費に加え、厚生労働省、文部科学省、HS 財団などから援助を受けた。

以下に本年度の業績を記す。

業績

調査・研究

I . プリオン病に関する研究

(1) 非定型的 BSE プリオンの近交系マウスへの伝搬実験

厚生労働省の全頭検査(2001 年～)及び農水省の死亡牛検査(2003 年～)により、我が国では 32 頭の BSE 罹患ウシが確認されている(2007 年 3 月 31 日現在)。このうち 24 例目の罹患ウシ(BSE/JP24)では、脳内に蓄積した異常型プリオン蛋白質の糖鎖型が、典型 BSE の異常型プリオン蛋白質とは異なり、むしろヒト・孤発性 CJD に類似していた(平成 17 年度年報参照)。このような非定型 BSE は、伊、仏、独、米国などにおいても近年発見されており、その起源や感染性について議論がなされているが、未だ不明な点が多い。そこで非定型 BSE プリオンの感染性の検証、および生化学的・病理学的性状を解析するため、BSE/JP24 の脳ホモジネートを近交系マウス 3 系統の脳内に接種した。典型 BSE を接種したマウス対照群とともに、現在、経過を観察中である。

[萩原健一、山河芳夫、中村優子、大内史子]

(2) 霊長類(カニクイザル)への BSE の伝達・脳内接種による発症とそれに伴う行動解析

ヒト vCJD の発症モデルとして、カニクイザル(cynomolgus macaques)への BSE の伝達を試みた。BSE 感染ウシ(典型例; BSE/JP6)の 10% 脳乳剤、0.2ml を幼若カニクイザルに脳内接種したところ、3 頭中 2 頭(#7, #10)において接種後 26 ヶ月目頃より驚愕・過敏反応等の行動異常が認められ、次いで振戦や麻痺などの神経症状が顕著となった。これらの症状は緩徐進行性に経過し、発症の約 3 ヶ月後に起立不能となった。前肢運動機能評価(アップルテスト)では、発症に伴う報酬回収時間の遅延が認められた。一方、記憶能試験(指迷路試験)では、神経症状の発現初期には成功率に顕著な変化は認められな

かったが、症状の進行に伴い迷路実施中の折り返し操作の増加、および成功率の低下が認められた。また脳波は、発症期から末期にかけて波が不明瞭となるが、孤発性CJDに特徴的なPSDは認められなかった。

[山河芳夫、中村優子、萩原健一、佐藤由子・飛梅実・佐多徹太郎（感染病理部）、小野文子（予防衛生協会）、寺尾恵治（医薬基盤研・霊長類センター）]

(3) 霊長類（カニクイザル）へのBSEの伝達・脳内接種後のプリオンの生体内分布の解析

BSEプリオンを脳内接種したカニクイザルの組織について、病理学的・生化学的な解析を行った。脳の病理解析では、ヒト変異型CJDに特徴的なflorid plaqueに相当する免疫染色像を大脳皮質に認めた。一方、視床には、BSEの場合と類似した線状・顆粒状のプリオンの蓄積像を認めた。ウエスタンブロット(WB)法による生化学的分析の結果、脳及び中枢神経組織にはvCJD/BSEプリオンと同様の2B型(4型)プリオンが顕著に蓄積していることがわかった。さらにWB法により末梢の組織、臓器についてプリオンを精査したところ、#7のサルでは座骨神経/正中神経などの末梢神経および顎下リンパに極微量(脳の1/1000以下)の蓄積を認めたが、#10の末梢神経系およびリンパ節ではプリオンを検出できなかった。なお、いずれの個体においても、実質臓器及び白血球画分にはプリオンを検出することができなかった。

[山河芳夫、中村優子、萩原健一、佐藤由子・飛梅実・佐多徹太郎（感染病理部）、小野文子（予防衛生協会）、寺尾恵治（医薬基盤研・霊長類センター）]

(4) P9ペプチドによる異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})蓄積の阻害機構についての研究

プリオンを感染させたマウス神経芽腫細胞(ScN2a細胞)においては、内因性の正常型プリオン蛋白質(PrP^C)が異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})に変換されて、細胞に蓄積する。今回、PrP^Cに由来するペプチド(P9)がScN2a細胞でのPrP^{Sc}の産生・蓄積を顕著に阻害することを見出し、その抗プリオン活性の発現機作を検討した。その結果、P9はPrP^Cの合成・分解には影響を与えずに、PrP^{Sc}の蓄積量を減少させることが明らかとなった。リソソームプロテアーゼに対する阻害剤によりP9の活性は減弱されたが、プロテアソーム阻害剤によるP9の活性低下や、オートファジーのマーカー分子(LC3-II)の上昇は認められなかった。さらに免疫染色法による観察から、細胞内のPrP^{Sc}蓄積部位へのカテプシンDの集積をP9が促進することが示唆された。以上より、P9はリソソームによる

PrP^{Sc}の分解を促進すると考えられる。

[中村優子、山河芳夫、谷田以誠、萩原健一]

(5) P9ペプチドの構造と活性の相関についての検討

P9の一次構造と抗プリオン活性との相関を検討した。電子顕微鏡による観察から、P9はアミロイド様の線維構造を容易に形成することがわかった。興味深いことに、P9のアミノ酸配列を反転させたペプチド(Rv)、あるいはアミノ酸を任意の配列に再配置したペプチド(Rm)も同様の線維を形成した。このような物理化学的性質は、平行βシートをモチーフとする繊維状ペプチドにおいて指摘されており、P9も平行βシート構造を有すると類推された。酵母プリオンのSup35蛋白質に由来するペプチドは、平行βシート構造による線維を形成することが知られている。そこで、P9、Rv、Rm、Sup35ペプチドについて、ScN2a細胞での抗プリオン活性を比較・検討した。その結果、Rv、RmはP9と同等の活性を発揮したが、Sup35は無効であった。また、P9のC末端部を欠失させると活性が著しく低下することも明らかとなった。

[中村優子、山河芳夫、花田賢太郎、萩原健一]

(6) プリオン病の発症過程における脳のプロテオーム変動解析

マウス順化スクレーピー病原体(Obihiro I株)を接種したマウスの脳を対象として、PrP^{Sc}の蓄積に伴って変動する蛋白質の経時的・網羅的解析を進めている。これまでに、PrP^{Sc}の脳内への蓄積が顕著となる100日目以降においてGFAP、抗酸化ストレス蛋白質群が増加すること、vacuolar ATPaseの膜表在サブユニットが減少すること、さらにCRMP-2のC末端領域の欠失したアイソフォームが増加することを明らかにしてきた。本年度は、CRMP-2のC末端領域をMS/MS質量分析法により解析し、C末端部の欠失がCRMP-2の機能(神経軸索の伸展)調節に必須のリン酸化部位を含む領域に生じていることを明らかにした。これまでに得た実験データから、欠失は転写レベル(mRNAのスプライシング)によるものではなく、翻訳後の蛋白質切断によると考えている。

[大内史子、萩原健一、中村優子、山河芳夫]

(7) プリオンへの感染におけるスフィンゴ糖脂質の役割の解析

ScN2a細胞をグルコシルセラミド合成酵素に対する阻害剤(PDMP)とともに培養するとPrP^{Sc}の産生・蓄積が阻害される。一方、フモニシンなどによるセラミド生合成の阻害は、PrP^{Sc}の産生・蓄積へ影響しない。このよう

な培養細胞での実験結果をもとに、プリオンへの感染におけるスフィンゴ糖脂質の役割を個体レベルにおいて検討すべく、ガングリオシド生合成酵素のノックアウト・マウス2系統にスクレーパー病原体 (Obihiro I株) を脳内または腹腔内に接種した。現在、経過を観察中である。

[萩原健一、山河芳夫、大内史子、中村優子、花田賢太郎、山下匡 (北大・先端生命科学研究院)]

・オートファジーに関わる研究

(1) オートファジー評価系とオートファジーモニター細胞株の確立

オートファジーは、細菌感染をはじめ、ウイルス感染・増殖、細胞内タンパク質凝集体との関わりがある。まず基盤となるためのオートファジーを評価する実験系を確立した。また、現在オートファジーのマーカーとして使われている GFP-LC3 の問題点が指摘されているために、それに対する陰性コントロールの系を作成した。また、ウイルス感染・増殖とオートファジーの関係を視覚化し、細胞生物学的に明らかにするために、GFP-ヒト LC3 を発現する安定発現株を樹立した。今後、これらの系を用いて研究を展開していく予定である。

[谷田以誠、山地俊之、花田賢太郎]

・病原体感染における宿主細胞機能に関する研究

1. C型肝炎ウイルス(HCV)に関する研究

(1) HCV コアタンパク質発現細胞における脂肪酸合成の上昇

HCV コアタンパク質は宿主細胞機能に様々な影響を及ぼすことが知られている。今回我々は、コアタンパク質発現・非発現肝培養細胞を用いて脂肪酸代謝を解析した結果、コアタンパク質発現細胞において脂肪酸合成の有意な上昇がみられた。特に、脂肪酸合成の律速酵素であるアセチル CoA カルボキシラーゼ1の遺伝子発現・タンパク質量の上昇、酵素活性の上昇が認められた。この現象と HCV 感染における脂肪蓄積との関連が注目される。

[深澤征義、田中康仁、花田賢太郎、西島正弘、鈴木哲朗 (ウイルス第二部) 宮村達男(所長)]

(2) HCV 産生に対する宿主タンパク質ピメンチンの影響

HCV コアタンパク質はウイルス構造タンパク質としてウイルス産生に必須の分子である。昨年度、コアタンパク質発現・非発現肝培養細胞の界面活性剤不溶性画分を用いた比較プロテオーム解析から、コアタンパク質発現細胞でピメンチン(中間径フィラメント蛋白質)の顕著

な低下がみられた。そこで、宿主ピメンチン分子発現量とウイルス産生能の関連について、宿主細胞におけるピメンチンの過剰発現及びノックダウン(siRNA)により検討した。過剰発現によりウイルス産生は低下し、ノックダウンによりウイルス産生が上昇したことから、宿主ピメンチン発現量が HCV 産生に重要であることが明らかとなった。

[深澤征義、笠原優子、花田賢太郎、西島正弘、鈴木哲朗・脇田隆字(ウイルス第二部) 宮村達男(所長)]

2. シンドビスウイルス(SINV)の複製に関わる宿主因子変異株の分離

我々は、SINVの複製に伴う細胞死を利用して、同ウイルスの RNA 複製過程に関わる宿主因子の変異株の分離を試みた。過剰発現によって SINV 複製を抑制するような遺伝子を見出すことを目的として、HeLa 細胞 cDNA ライブラリーを CHO 細胞に導入した後、SINV を感染させ、生き残る細胞株をスクリーニングした。~10⁷細胞をスクリーニングしたが、細胞死耐性株は得られなかった。今後は機能欠失型変異株を作製し、同様のスクリーニングを行う予定である。また、SINV による RNA 複製をレポーター蛋白質の活性でモニターできる SINV レプリコンを用い、より複製過程に焦点を絞ったスクリーニング系を構築している。

[齊藤恭子、花田賢太郎]

3. 病原体感染におけるイノシトールリン脂質動態の研究

(1) イノシトールリン脂質プローブの作製

イノシトールリン脂質群は細胞膜の構成成分であるとともに様々な細胞外刺激や細胞外環境の変化を細胞内へと伝達する情報伝達物質として極めて重要な役割を担っている。我々は C型肝炎ウイルス(HCV)あるいは異常型プリオンの感染に応答した宿主細胞内におけるイノシトールリン脂質群動態を詳細に検討するため、それぞれのイノシトールリン脂質に特異的に結合するタンパク質ドメインを蛍光タンパク質 mVenus と融合したプローブタンパク質を作製し、その評価を行った。今回用いたタンパク質ドメインは P40PHOX の PX ドメイン(ホスファチジルイノシトール(PI) 3-リン酸と結合)、FAPP1 の PH ドメイン(PI 4-リン酸と結合)、TAPP1 の PH ドメイン(PI 3,4-二リン酸と結合)、PLCδ の PH ドメイン(PI 4,5-二リン酸と結合)、GRP1 の PH ドメイン(PI 3,4,5-三リン酸と結合)である。これらの mVenus 融合タンパク質は細胞内において、それぞれエンドソーム、ゴルジ体・小胞

体、細胞膜等へ局在することが観察され、イノシトールリン脂質群の動態解析に有用であることが明らかとなった。

[前濱朝彦、花田賢太郎]

(2) HCV 感染におけるイノシトールリン脂質動態の解析

前項にて作製したイノシトールリン脂質プローブを発現したヒト肝癌細胞 Huh-7 に対して HCV JFH-1 株を感染させ、イノシトールリン脂質動態を解析した。なお感染性 HCV は、Huh-7.5.1 細胞に JFH-1 ゲノム RNA を導入し培養上清を回収することによって調製した。本解析では、HCV 感染後 2 時間まで各イノシトールリン脂質プローブの動態を経時的に観察したが、現在のところ有意な変化を見いだすことはできていない。このことは、HCV 感染の初期応答においてはイノシトールリン脂質群の大きな変化は起きていないことを示唆している。しかしながら、本解析では比較的力価が低い HCV 標品を用いており、今後より高力価の HCV を用いた解析を行うこと、またより長時間の経時変化を解析することが必要であると考えられる。

[前濱朝彦、深澤征義、花田賢太郎]

(3) HCV 感染によって変化する細胞内情報伝達システムの解析

前項と同様に Huh-7 細胞に対して HCV 感染を行い、その時の細胞内情報伝達システムの変化を、様々な細胞内シグナル分子群の活性や発現量を指標に解析した。なお、本解析ではウイルス複製に深く関与することが予想されるタンパク質合成シグナルを中心に解析を行った。その結果、タンパク質合成の主要制御因子であるタンパク質キナーゼ mTOR の下流に位置する S6 キナーゼ (S6K) の活性が HCV 感染後一過的に減少し、約 2 時間後には元の活性レベルに戻るのが観察された。この時 mTOR 上流に位置するタンパク質キナーゼ B (PKB) の活性には変化が見られないことから、HCV 感染が感染初期過程において mTOR 制御系の近傍に作用し S6K の活性化を引き起こしていると考えられた。この S6K の一過的な不活性化の生理的意義およびそのメカニズムの解析は HCV 感染メカニズムの理解に大きく寄与すると考えられる。

[前濱朝彦、花田賢太郎]

・細胞外環境変化を感知し応答する細胞内情報伝達システムの研究

(1) 哺乳動物細胞におけるタンパク質合成制御システムの解析

哺乳動物細胞におけるタンパク質合成は、細胞外環境（栄養素、ホルモン）の変化に応じてその活性が大きく変化することが知られているが、現在のところこの制御に関わる細胞内情報伝達系はほとんど明らかにされていない。今回我々は遺伝子発現阻害法によってタンパク質合成系の制御因子群を包括的に探索し、いくつかの候補分子を単離することに成功した。このなかには mTOR を直接制御する低分子量 GTP 結合タンパク質 Rheb の活性化因子と推測される分子やイノシトールリン脂質代謝に関与する分子群が含まれていることから、今まで全く知られていなかった分子群の関与が示唆されており興味深い。今後はこれら単離した分子群の連関性を明らかにすることによりタンパク質合成制御系のさらなる解明を試みるとともに、ウイルスが自己タンパク質の複製を目的として宿主細胞のタンパク質合成系をどのように利用しているかを検討する。

[前濱朝彦、花田賢太郎]

(2) ストレス応答性の新規癌抑制遺伝子産物 PICT-1 の細胞内動態解析

我々は以前の研究においてヒト神経芽腫の発症に関与する新規癌抑制遺伝子として PICT-1 を単離・同定した。本年度の研究において我々は、発現抑制による PICT-1 の不活性化がもう一つの重要な癌抑制遺伝子産物 PTEN の不活性化を引き起こし、PI 3-キナーゼ (PI3K)、PKB、S6K の恒常的活性化を惹起すること、さらにその結果として細胞増殖の亢進および細胞の不死化を誘導することを明らかにした。さらに、多様なキナーゼ阻害剤や RNA 合成阻害剤、酸化ストレス、細胞傷害性サイトカインなどのアポトーシス誘導性ストレスが PICT-1 タンパク質の分解を誘導することを見だし、この分解がプロテアソーム依存性であることを明らかにした。この現象からは、PICT-1 の分解が PI3K 依存性の生存シグナルを活性化して、外界のストレスによるアポトーシス誘導に対抗する機構の存在が示唆され、新たな細胞死制御系の一つとしてそのさらなる解明が期待される。

[岡原史明、前濱朝彦]

(3) PTEN 阻害剤の探索とその生理作用の解析

癌抑制遺伝子産物 PTEN が制御する PI3K シグナル経路は、細胞増殖やアポトーシス、あるいは細胞膜輸送に関与することが明らかにされている。本研究では、抗炎症作用と創傷治癒作用のほか、殺菌作用、抗潰瘍作用が報告されている *Lithospermum erythrorhizon* の色素シコニンが PTEN の阻害剤として作用することを明らかにした。

シコニンタンパク質チロシンホスファターゼにも作用するが、PTENにはより低い濃度で有効に作用すること、またシコニン処理を行った細胞ではPTENの阻害によるPI3Kシグナル経路の活性化が惹起されることを見いだした。さらにシコニンに類似した構造を有する他のナフトキノロン類にもPTEN阻害作用があることを見いだしており、今後これらの化合物による阻害機構の解析から、より選択的なPTEN阻害剤の開発が期待される。

[前濱朝彦、櫛木修(広島大学院)]

・高等動物細胞におけるスフィンゴ脂質の代謝と機能に関する研究

1. 病原体等の侵入とスフィンゴ脂質に関する研究

(1) 志賀毒素に耐性を示す動物細胞変異株のスクリーニング

志賀毒素はスフィンゴ糖脂質 Gb3 を受容体として細胞内に侵入し、小胞体よりサイトゾルへと透過する。我々はこの志賀毒素の細胞内輸送機構、あるいは受容体である Gb3 の代謝機構解明を目的として、CHO 細胞を用いた志賀毒素耐性株単離のスクリーニング系を構築した。CHO 細胞は Gb3 を発現していないため、Gb3 合成酵素を安定発現させることで Gb3 陽性 CHO 細胞株を得た。これらの株に志賀毒素を添加したところ予想通り濃度依存的に細胞死を引き起こした。今後、この株を用いて志賀毒素耐性株単離のスクリーニングを行う予定である。

[山地俊之、花田賢太郎、西川喜代孝(同志社大学院生命医科学)]

(2) 糖脂質 GM1 の代謝・輸送変異株のスクリーニング

ガングリオシド GM1 はコレラ毒素や SV40 等の受容体であり、また脂質ラフトのマーカースとして用いられている。我々はガングリオシドの代謝輸送に關与する因子を探索するため、GM1 代謝輸送異常変異株単離のためのスクリーニング系構築に着手した。CHO 細胞は GM1 の発現が見られないが、GM2 合成酵素を安定発現させることで GM1 陽性 CHO 細胞株を得た。これらの細胞株はコレラ毒素 B サブユニットによる細胞染色で強陽性を示したことにより、セルソーターによる GM1 発現変異株単離の親株として今後使用する予定である。

[山地俊之、花田賢太郎]

(3) リシンのエンドソームからゴルジ体への輸送に対するスフィンゴ脂質の役割

ヒマ豆由来の猛毒リシンは、エンドソームからゴルジ体、小胞体を経た後に細胞質に移動して細胞毒性を発揮

すると考えられている。細胞のスフィンゴ脂質含有量を低下させると、リシンのエンドソームからゴルジ体への移行が早くなり、細胞のリシン感受性も増加した。これらの結果から、エンドソームからゴルジ体へのリシン輸送は、スフィンゴ脂質によって制御されていることを示唆した。

[花田賢太郎、Stine Grimmer, Bjorn Spilsberg, Kirsten Sandvig(オスロ大学)]

2. 細胞内セラミド選別輸送に関する研究

(1) 小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送をつかさどる蛋白質 CERT のリン酸化の役割

CERT の N 末端領域には PI4P を認識してゴルジ体にターゲットする PH ドメインが存在し、C 末端領域にはセラミドの膜間転移活性を持つ START ドメインが存在する。両ドメインの間の領域(MR)には小胞体と相互作用するペプチドモチーフ(FFAT motif)がある。本年度は、MR に存在するセリン繰り返しモチーフ(serine repeat motif: SRM)が多重リン酸化を受けていることを明らかにし、さらにこのリン酸化によって、CERT の小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送活性が抑制されることを見出した。

[熊谷圭悟、大内史子、花田賢太郎]

(2) リン酸化による CERT 機能抑制メカニズム

CERT の SRM が多重リン酸化されると、PH ドメインの PI4P 結合活性が抑制され、同時に START ドメインのセラミド転移活性も抑制された。興味深いことに、START ドメインを除くと PI4P 結合活性が回復し、一方、PH ドメインを除くとセラミド転移活性が回復した。これらの結果は、SRM がリン酸化されると PH ドメインと START ドメインがお互いをマスクして両ドメインの活性を抑制制御することを示唆している。

[熊谷圭悟、河野美幸、花田賢太郎]

(3) 過剰生産すると SM 生産を阻害するキナーゼ

昨年度までに、SM 合成に関わるタンパク質のリン酸化を通じて、SM 合成を負に制御していると示唆されるキナーゼとして Casein kinase $\gamma 2$ (CKI $\gamma 2$)を見出した。CKI $\gamma 2$ を CHO 細胞に安定導入して解析したところ、SM 合成酵素や分解酵素の活性には影響がなく、小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送が抑制されていた。CERT の状態を調べると CKI $\gamma 2$ の導入によって、SRM の多重リン酸化が起こっていた。SRM は CKI の認識コンセンサス配列に相当するモチーフである。よって、CKI $\gamma 2$ は SRM の多重リン酸化に関与し、CERT の活性を制御すると示唆された。

[富重斉生、花田賢太郎、楠田潤(基盤研)]

検体数：7件(うち1件陽性)

(4) CERTのセラミド転移ドメインの結晶構造

CERTの膜間セラミド転移活性は、そのC末端領域約250アミノ酸が形成するSTARTドメインが担っている。このSTARTドメインとセラミドとの共結晶のX線構造解析によって、STARTドメインのどのアミノ酸がセラミド分子と水素結合や疎水的相互作用をしているかが明らかとなった。また、CERTがセラミドを特異的に認識する原子レベルでのメカニズムが提唱できた。

[花田賢太郎、熊谷圭悟、工藤紀雄・加藤龍一・若槻壮市(高エネ研)]

・抗感染症薬を指向した代謝阻害剤の研究**(1) HCV産生のフラレン化合物による阻害**

HCV感染に対する治療薬はインターフェロン(インターフェロン+リバビリン)のみが現在用いられ、効果・副作用の観点から新たな治療薬の開発が求められている。試験管内酵素アッセイにおいてHCV RNAポリメラーゼ(NS5B)阻害活性を示したある種のフラレン化合物を用い、細胞レベルでウイルスRNA複製能・HCV産生能を検討した。その結果、細胞レベルでもウイルスRNA複製およびHCV産生が阻害され、ある種のフラレン化合物が抗HCV薬の候補となりうる事が示唆された。

[深澤征義、笠原優子、花田賢太郎、西島正弘、鈴木哲朗・村上恭子・脇田隆字(ウイルス第二部)、宮村達男(所長)、中村成夫・下遠野久美子・増野匡彦(共立薬科大学)]

(2) 真菌イノシトールホスホセラミド合成酵素の阻害剤探索系

イノシトールホスホセラミド(IPC)関連脂質は、真菌類などには存在するが哺乳動物細胞には存在しない脂質群である。IPC合成を司る酵素・IPCSは、真菌の生育に必須の遺伝子産物である。IPCS活性の半自動化検出系を構築の上、合成化学物質ライブラリーを中心に約2万化合物、さらに放線菌培養プロスに対するIPCS阻害剤のスクリーニングを行った。その結果、ヒット化合物が複数得られた。

[富重斉生、花田賢太郎、田端祐二・鈴木重輝・大山真・星子繁(明治製菓)]

・行政検査実績

項目：ウシ海綿状脳症のウエスタンプロット法による確認検査

期間：18年4月1日～平成19年3月31日

・機器管理運営委員会機器の管理と運用

戸山庁舎のMALDI-飛行時間型質量分析機(Voyager-DE STR、AXIMA-QIT、各1台)の保守、運用を行った。機器の主たる利用者は、プロテオーム研究に携わる感染研(戸山庁舎・村山庁舎)の研究者であり、利用者に対しては試料の前処理法を含めた機器の操作法の説明・助言を行った。また、機器本体の消耗品の交換、トラブルへの迅速な対処とともに、プロテオーム研究に必須なデータベース検索ソフト・ハードウェアを整備・管理し、利用者にはソフトウェアの操作法について説明を講じた。なお、機器の使用時間(データベース検索のための使用時間を除く)は、約150時間(Voyager-DE STR)および約200時間(AXIMA-QIT)であった。[大内史子、佐藤慈子、山河芳夫、萩原健一、花田賢太郎]

発表業績一覧**I. 誌上発表**

1. 欧文発表

- 1) Yanagisawa, Y., Sato, Y., Asahi-Ozaki, Y., Ito, E., Honma, R., Imai, J., Kanno, T., Kano, M., Akiyama, H., Sata, T., Shinkai-Ouchi, F., Yamakawa, Y., Watanabe, S., and Katano, H.: Effusion and solid lymphomas have distinctive gene and protein expression profiles in an animal model of primary effusion lymphoma. *J. Pathol.*, 209, 464-73, 2006
- 2) Furuoka, H., Yabuzoe, A., Horiuchi, M., Tagawa, Y., Yokoyama, T., Yamakawa, Y., Shinagawa, M., and Sata, T.: Species-specificity of a panel of prion protein antibodies for the immunohistochemical study of animal and human prion diseases. *J. Comp. Pathol.*, 136, 9-17, 2007
- 3) Hagiwara, K., Nakamura, Y., Nishijima, M., and Yamakawa, Y.: Prevention of prion propagation by dehydrocholesterol reductase inhibitors in cultured cells and a therapeutic trial in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, in press.
- 4) Tanida, I., Wakabayashi, M., Kanematsu, T., Minematsu-Ikeguchi, N., Sou, Y.S., Hirata, M., Ueno, T., Kominami, E.: Lysosomal turnover of GABARAP-phospholipid conjugate is activated during differentiation of C2C12 cells to myotubes without inactivation of the mTor kinase-signaling pathway. *Autophagy*. 2, 264-271, 2006
- 5) Demarchi, F., Bertoli, C., Copetti, T., Tanida, I., Brancolini, C., Eskelinen, E.L., Schneider, C.: Calpain is required for macroautophagy in mammalian cells. *J Cell Biol.*

- 175,595-605, 2006
- 6) Mizokami, A., Kanematsu, T., Ishibashi, H., Yamaguchi, T., Tanida, I., Takenaka, K., Nakayama, K.I., Fukami, K., Takenawa, T., Kominami, E., Moss, S.J., Yamamoto, T., Nabekura, J., Hirata, M.: Phospholipase C-related inactive protein is involved in trafficking of gamma2 subunit-containing GABA_A receptors to the cell surface. *J Neurosci.* 27,1692-1701, 2007.
- 7) Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Ogawa, S., Kaufman, R.J., Kominami, E., Momoi, T.: ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ.* 14,230-239, 2007.
- 8) Sato, S., Fukasawa, M., Yamakawa, Y., Natsume, T., Suzuki, T., Shoji, I., Aizaki, H., Miyamura, T. and Nishijima, M.: Proteomic profiling of lipid droplet proteins in hepatoma cell lines expressing hepatitis C virus core protein. *J. Biochem.* 139, 921-930, 2006
- 9) Fukasawa, M., Tanaka, Y., Sato, S., Ono, Y., Nitahara-Kasahara, Y., Suzuki, T., Miyamura, T., Hanada, K., and Nishijima, M.: Enhancement of *de novo* fatty acid biosynthesis in hepatic cell line Huh7 expressing hepatitis C virus core protein. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 1958-1961, 2006
- 10) Shirakura, M., Murakami, K., Ichimura, T., Suzuki, R., Shimoji, T., Fukuda, K., Abe, K., Sato, S., Fukasawa, M., Yamakawa, Y., Nishijima, M., Moriishi, K., Matsuura, Y., Wakita, T., Suzuki, T., Howley, P.M., Miyamura, T., and Shoji, I.: The E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 81, 1174-1185, 2007
- 11) Saito, K., Nishijima, M., and Kuge, O: Phosphatidylserine is involved in gene expression from Sindbis virus subgenomic promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345, 878-885, 2006
- 12) Suzuki, T., Kanai, Y., Hara, T., Sasaki, J., Sasaki, T., Kohara, M., Maehama, T., Taya, C., Shitara, H., Yonekawa, H., Frohman, M. A., Yokozeki, T., and Kanaho, Y.: Crucial role of the small GTPase ARF6 in hepatic cord formation during liver development. *Mol. Cell. Biol.*, 26, 6149-6156, 2006
- 13) Nigorikawa, K., Yoshikawa, K., Sasaki, T., Iida, E., Tsukamoto, M., Murakami, M., Maehama, T., Hazeki, K., and Hazeki, O.: A naphthoquinone derivative, Shikonin, has insulin-like actions by inhibiting both phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 and tyrosine phosphatases. *Mol. Pharmacol.*, 70, 1143-1149, 2006
- 14) Okahara, F., Itoh, K., Nakagawara, A., Murakami, M., Kanaho, Y., and Maehama, T.: Critical role of PICT-1, a tumor suppressor candidate, in phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate signals and tumorigenic transformation. *Mol. Biol. Cell*, 70, 1143-1149, 2006
- 15) Naito, Y., Takematsu, H., Koyama, S., Miyake, S., Yamamoto, H., Fujinawa, R., Sugai, M., Okuno, Y., Tsujimoto, G., Yamaji, T., Hashimoto, Y., Itohara, S., Kawasaki, T., Suzuki, A., and Kozutsumi, Y.: Germinal center marker GL7 probes activation-dependent repression of N-glycolylneuraminic acid, a sialic acid species involved in the negative modulation of B-cell activation. *Mol. Cell. Biol.*, in press.
- 16) Hanada, K.: Discovery of the molecular machinery CERT for endoplasmic reticulum-to-Golgi trafficking of ceramide. *Mol. Cell. Biochem.* 286, 23-31, 2006
- 17) Wang, S., Maitah, M. Y. A., Hanada, K., Kessel, D., and Duska Separovic, D.: Ceramide response post-photodamage is absent after treatment with HA14-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345, 803-808, 2006
- 18) Grimmer, S., Spilsberg, B., Hanada, K., and Sandvig, K.: Depletion of sphingolipids facilitates endosome to Golgi transport of ricin. *Traffic* 7, 1243-1253, 2006
- 19) Cheng, Z.-J., Singh, R. D., Sharma, D. K., Holicky, E. L., Hanada, K., L. Marks, D., and Pagano, R. E.: Distinct mechanisms of clathrin-independent endocytosis have unique sphingolipid requirements. *Mol. Biol. Cell.* 17, 3197-3210, 2006
- 20) Kawano, M., Kumagai, K., Nishijima, M., and Hanada, K.: Efficient trafficking of ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus requires a VAMP-associated protein-interacting FFAT motif of CERT. *J. Biol. Chem.* 281, 30279-30288, 2006
- 21) Hanada, K., Kumagai, K., and Tomishige, N., Kawano, M.: CERT and intracellular trafficking of ceramide. *Biochim. Biophys. Acta*, in press, 2007

学会発表

1. 国際学会

- 1) Hagiwara, K., Nakamura, Y., Yamakawa, Y., Sato, Y., Tobiume, M., Sata, T., and the Expert Committee for BSE diagnosis: Studies on the second atypical BSE case in a Japanese black cow, *NeuroPrion* 2006, October 4-6, 2006, Torino, Italy

- 2) Sasaki, Y., Kawakami, T., Shinkai-Ouchi, F., Yamakawa, Y., Arakawa, Y., and Sasaki, T.: Proteomics of *Mycoplasma penetrans* by two-dimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry, IOM2006, July 9-15, 2006, Cambridge, UK
- 3) Fukasawa, M., and Nishijima, M.: Isolation of a mammalian cell mutant defective in lipid droplet biogenesis, The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology/11th FAOBMB Congress, June 23, 2006, Kyoto, Japan
- 4) Fukasawa, M., Tanaka, Y., Ono, Y., Sato, S., Suzuki, T., Miyamura, T., Hanada, K., and Nishijima, M.: Enhancement of de novo fatty acid biosynthesis in hepatic cell line Huh7 expressing hepatitis C virus core protein, The 13th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, August 28, 2006, Cairns, Australia
- 5) Saito, K., Nishijima, M., and Kuge, O.: Phosphatidylserine deficiency impairs Sindbis virus subgenomic promoter-driven gene expression. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, June 18-23, 2006, Kyoto, Japan
- 6) Maehama, T.: PICT-1: a PTEN regulator involved in tumorigenesis. 2nd International Symposium of the 21st Century COE Program, 2006.6.23-25, Akita, Japan
- 7) Mitsutake, S., Hanada, K., Igarashi, Y.: An intracellular generation site of Ceramide 1-phosphate, 20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, June 19, 2006, Kyoto, Japan
- 8) Kumagai, K., Kawano, M., Ohuchi, M., Nishijima, M., Hanada, K.: Regulation of ER-to-Golgi trafficking of ceramide by phosphorylation of CERT and its molecular mechanism, 20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, June 20, 2006, Kyoto, Japan
- 9) Kawano, M., Kumagai, K., Nishijima, M., and Hanada, K.: Interaction between CERT and VAP at the ER is required for efficient trafficking of ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus, 20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, June 20, 2006, Kyoto, Japan
- 10) Tomishige, N., Kumagai, K., Kusuda, J., Nishijima, M., Hanada, K.: A Ser/Thr kinase capable of down-regulating the synthesis of sphingomyelin by phosphorylation of the ceramide transfer protein CERT, 20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, June 20, 2006, Kyoto, Japan
- 11) Kudo, N., Kumagai, K., Wakatsuki, S., Nishijima, M., Hanada, K., Kato, R.: Crystal structures of the ceramide transfer START domain of CERT in complex with lipid substrates and a specific inhibitor, 20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, June 20, 2006, Kyoto, Japan
- 12) Hanada, K.: Regulation of CERT-mediated trafficking of ceramide, 20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, June 22, 2006, Kyoto, Japan
- 13) K. Hanada: Regulation of intracellular trafficking of ceramide, FEBS special meeting, New concepts in lipidology: from lipidomics to disease, October 22-25, 2006, Noordwijkerhout, The Netherlands

2 . 国内学会

- 1) 萩原健一、佐藤由子、中村優子、飛梅実、山河芳夫、佐多徹太郎：非定型的 BSE プリオン（佐世保例）の生体内分布、2006 年プリオン研究会（文部科学省「人獣共通感染症研究クラスター」支援事業）2006.9.2-3、安比高原、岩手
- 2) 大内史子、萩原健一、中村優子、西島正弘、山河芳夫：プリオン病のプロテオーム解析～発症に伴う CRMP-2 の量的・質的变化の解析、2006 年プリオン研究会（文部科学省「人獣共通感染症研究クラスター」支援事業）2006.9.2-3、安比高原、岩手
- 3) 萩原健一、中村優子、山河芳夫：プリオン病とたんぱく質・脂質・糖質生化学の接点、第 19 回バイオメディカル分析科学シンポジウム（日本薬学会・物理系薬学部会主催）2006.8.1-3、福岡
- 4) 笠原（仁田原）優子、大内史子、深澤征義、花田賢太郎、鈴木哲朗、宮村達男、西島正弘：C 型肝炎ウイルス (HCV) コア発現細胞における vimentin の減少、第 54 回日本ウイルス学会学術集会、2006.11.21、名古屋
- 5) 深澤征義、田中康仁、佐藤慈子、笠原（仁田原）優子、鈴木哲朗、宮村達男、花田賢太郎、西島正弘：C 型肝炎ウイルスコア蛋白質発現培養肝細胞における脂肪酸合成の上昇、日本薬学会第 127 年会、2007.3.28、富山
- 6) 笠原（仁田原）優子、深澤征義、中村成夫、下遠野久美子、村上恭子、鈴木哲朗、宮村達男、花田賢太郎、西島正弘、増野匡彦：フラレン誘導体による C 型肝炎ウイルス (HCV) 産生の阻害、日本薬学会第 127 年会、2007.3.28、富山
- 7) 前濱朝彦: PTEN 制御因子 PICT-1 による発がん制御,

- 群馬大学 21 世紀 COE 若手研究者シンポジウム、
2006.10.4 5、前橋
- 8) 前濱朝彦、花田賢太郎:mTOR 活性化シグナルにおける
イノシトールリン脂質群の関与、日本プロテインホスフ
ァターゼ研究会 第3回国内集会、2007.3.30 31、津
- 9) 花田賢太郎: セラミド輸送タンパク質 CERT の基質
認識メカニズム、第1回スフィンゴ・セラピー研究会、
2006.5.27、鳥取
- 10) 光武進、花田賢太郎、五十嵐靖之: セラミド 1-リン
酸産生経路の解明、第48回日本脂質生化学会、2006.6.29、
東京
- 11) 杉木俊彦、寺沢宏明、熊谷圭悟、花田賢太郎、西島
正弘、嶋田一夫: 細胞内セラミド輸送分子 CERT の機能メ
カニズムの構造生物学的解析、第48回日本脂質生化学会、
2006.6.29、東京
- 12) 花田賢太郎: 細胞内脂質輸送を担うナノマシーン、
シンポジウム: 膜輸送ナノマシンの構造・機能とそ
の制御、2006.8.7、大阪
- 13) 花田賢太郎: 脂質セラミドの細胞内選別輸送とその
制御、京都大学大学院医学研究科セミナー、2006.9.8、
京都